Die unterschiedliche biologische Wirkung der seitenkettenaktiven Antipoden von Pentobarbital (Nembutal^{R}) und Vinylbitalum (Speda^{R})

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Wolfgang Grund

Saarbrücken

1969

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität des Saarlandes
Direktor: Professor Dr.med. W. RUMMEL

DIE UNTERSCHIEDLICHE BIOLOGISCHE WIRKUNG DER SEITENKETTENAKTIVEN ANTIPODEN VON PENTOBARBITAL (NEMBUTAL^{R}) UND VINYLBITALUM (SPEDA^{R})

INAUGURALDISSERTATION
zur Erlangung der
DOKTORWÜRDE
der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von
Wolfgang Grund

Dekan: Professor Dr.med. H. WITTER
Referent: Professor Dr.med. W. RUMMEL

1969

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Die mündliche Promotionsprüfung wurde abgelegt
am 11.11.69

M E I N E N E L T E R N

INHALTSÜBERSICHT

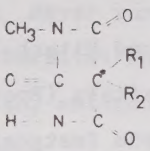
		Seite
I.	EINLEITUNG	4
II.	METHODIK	10
	1. Versuchsbedingungen	10
	2. Isolierung der Barbiturate	12
	3. Chromatographie und Nachweis	13
	4. Bestimmung	15
III.	ERGEBNISSE	17
	A. Untersuchungen mit Pentobarbital	17
	1. Narkotische Wirksamkeit	17
	2. Verteilung der optischen Antipoden des Pentobarbitals in Serum, Gehirn und Leber bei nicht induzierten Ratten	19
	3. Verteilung der optischen Antipoden des Pentobarbitals in Serum, Gehirn und Leber bei induzierten Ratten	23
	B. Untersuchungen mit Vinylbitalum	25
	1. Narkotische Wirksamkeit	25
	2. Verteilung der optischen Antipoden des Vinylbitalums in Serum, Gehirn und Leber bei nicht induzierten Ratten	25
	3. Verteilung der optischen Antipoden des Vinylbitalums in Serum, Gehirn und Leber bei induzierten Ratten	30

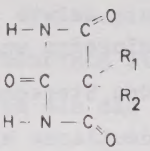
		Seite
IV.	DISKUSSION	31
V.	ZUSAMMENFASSUNG	39
VI.	LITERATUR	41
VII.	TABELLEN-ANHANG	46

I. EINLEITUNG

Unter den narkotisch und hypnotisch wirksamen Derivaten der Barbitursäure befindet sich eine ganze Anzahl optisch aktiver Verbindungen. Bei diesen kann das Asymmetriezentrum entweder im Barbituratring oder in einer Seitenkette liegen. Im Ring asymmetrische Barbiturate sind z.B. Hexobarbital (Evipan^{R}) und Methylphenobarbital (Prominal^{R}) (Abb. 1). Bei ihnen wird durch Methylierung eines Stickstoffatoms C-5 zum Asymmetriezentrum. Im Gegensatz dazu gehören Pentobarbital (Nembutal^{R}) und Vinylbitalum (Speda^{R}) zu den optisch aktiven Barbituraten, deren Asymmetriezentrum in einer der Seitenketten liegt.

Nach einem von KNABE (1,2) angegebenen Verfahren können Barbituratracemate in ihre optischen Antipoden gespalten werden. Hierzu bringt man das betreffende Racemat zusammen mit einer optisch aktiven Base (linksdrehendes N-Methylchininiumhydroxid) in Lösung. Die entstehenden diastereomeren Salze unterscheiden sich in ihrem Löslichkeitsverhalten, wodurch die Spaltung ermöglicht wird. Barbituratantipoden können auch direkt synthetisch gewonnen werden (3,4).





	R_1	R_2
Hexobarbital		$-CH_3$
Methylphenobarbital		$-C_2H_5$

	R_1	R_2
Pentobarbital	$-\overset{H}{\underset{CH_3}{C^*}}-CH_2-CH_2-CH_3$	$-C_2H_5$
Vinylbitalum	$-\overset{H}{\underset{CH_3}{C^*}}-CH_2-CH_2-CH_3$	$-CH=CH_2$

Abb. 1: Beispiele für optisch aktive Barbiturate mit Asymmetriezentrum im Ring und in der Seitenkette.

Erste Tierversuche mit optischen Antipoden von Barbituraten wurden von HSUEH und Mitarb. (5) sowie von KLEIDERER und Mitarb. (6) mitgeteilt, wobei keine oder nur mäßige Unterschiede hinsichtlich der Wirksamkeit zwischen den untersuchten Isomeren gefunden wurden.

Hingegen wurden von GIBSON und Mitarb. (7) zwischen den Stereomeren des Methohexitals (Brevimytal^{R}) deutliche Wirkungsunterschiede festgestellt. Bei diesem Barbiturat, das infolge zweier Asymmetriezentren 4 optische Isomere besitzt, ergab die pharmakologische Prüfung der 4 sterischen Komponenten und zweier Racemate für die α-dl-Form den besten therapeutischen Index. Die von GIBSON und Mitarb. (7) zwischen den Antipoden des Methohexitals festgestellten deutlichen Unterschiede in der narkotischen Wirksamkeit konnten hier an der Ratte bestätigt werden (8).

Untersuchungen mit Hexobarbital, das von KNABE (1) in die optischen Antipoden zerlegt worden war, wurden von WAHLSTRÖM (9) an der Ratte durchgeführt. Dabei

konnte gezeigt werden, daß zur Unterdrückung der elektroencephalographisch messbaren Aktivität des ZNS bei kontinuierlicher iv. Infusion vom (-)- im Durchschnitt 114 mg/kg, vom (+)-Hexobarbital hingegen nur 43 mg/kg benötigt werden. In Untersuchungen von HOFFMEISTER (1o), die in den Farbenfabriken Bayer vorgenommen wurden, erwies sich das (+)-Hexobarbital auch bei der Maus mehrfach stärker narkotisch, anticonvulsiv und toxisch als das (-)-Isomere.

Gleichzeitige Prüfung von Verteilung und metabolischer Elimination der Hexobarbital-Isomere von RUMMEL und Mitarb. an der Ratte vorgenommen (11, 12), sollten eine Erklärung für die unterschiedliche narkotische Wirksamkeit der optischen Antipoden liefern. Dabei ergab sich, daß das narkotisch wirksamere (+)-Hexobarbital, bezogen auf die Serumkonzentration, im Gehirn stärker angereichert wird als die (-)-Verbindung. Während dieser Befund mit der stärkeren narkotischen Wirksamkeit korreliert, läßt sich die raschere metabolische Elimination des (+)-Hexobarbitals, die in diesen Versuchen ebenfalls zum Vorschein kam, damit nicht in Einklang bringen.

Das Ergebnis von Versuchen, die mit den Antipoden des Methylphenobarbitals (Prominal^{R}) ebenfalls bei der Ratte durchgeführt wurden, war besonders aufschlußreich (13, 14). Es wurde nämlich gefunden, daß beim Methylphenobarbital in Analogie zum Hexobarbital der (+)-Antipode rascher metabolisch eliminiert und stärker im Gehirn angereichert wird. Jedoch erwies sich die (-)-Verbindung beim Methylphenobarbital als die narkotisch wirksamere.

Demnach kann bei optisch aktiven Barbituraten, deren Asymmetriezentrum im Ring liegt, sowohl das (+)- als auch das (-)-Isomere das narkotisch wirksamere sein. Unabhängig von der narkotischen Wirksamkeit können Unterschiede in der Verteilung und im Metabolismus der Isomere dieser N-methylierten Barbiturate auftreten.

In der hier vorliegenden Untersuchung sollte einerseits geprüft werden, inwieweit Unterschiede hinsichtlich der narkotischen Wirksamkeit, der Verteilung

und der metabolischen Elimination zwischen den Isomeren der beiden seitenkettenaktiven Barbiturate Pentobarbital und Vinylbitalum vorhanden sind. Andererseits sollten die dabei gewonnenen Ergebnisse im Vergleich mit Hexobarbital und Methylphenobarbital zeigen, inwieweit Analogien bzw. Unterschiede in der biologischen Wirkung der Isomere optisch aktiver Barbiturate mit dem Asymmetriezentrum in einer Seitenkette und anderen mit dem Asymmetriezentrum im Barbiturat-Ring bestehen.

II. METHODIK

1. Versuchsbedingungen

Für die Versuche wurden weibliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 15o - 2oo g verwendet. An diesen Tieren wurde die narkotische Wirksamkeit, die Verteilung in Serum, Gehirn und Leber sowie die metabolische Elimination der optischen Antipoden von Pentobarbital = 5-Äthyl-5-(1-methylbutyl)-barbitursäure(Nembutal^{R}) * und Vinylbitalum = 5-(1-Methylbutyl)-5-vinylbarbitursäure (Speda^{R}) * untersucht.

Die spezifische Drehung der verwendeten Isomere betrug beim Pentobarbital $[\alpha]_{589}^{24}$ + 7.8° und - 1o.6° bzw. $[\alpha]_{578}^{2o}$ + 4.2° und -4.4° ;

beim Vinylbitalum war $[\alpha]_{578}^{2o}$ + 7.2° und -13.2°.

Zur Herstellung der Injektionslösungen wurden (+)- bzw. (-)-Pentobarbital und Vinylbitalum mit

---

* Für die freundliche Überlassung der optischen Antipoden des Pentobarbitals und Vinylbitalums wird an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. rer.nat.J. KNABE, Direktor des Instituts für Pharmazeutische Chemie der Universität des Saarlandes, gedankt.

äquimolaren Mengen NaOH versetzt und die Lösung mit o,9 % NaCL bis zum Endvolumen aufgefüllt. Je nach Dosierung enthielten die Lösungen o,5 - 1,o % des jeweiligen Barbiturat-Antipoden. Diese Lösungen wurden in allen Versuchen in die Schwanzvene (Injektionsdauer 5 sec.) verabreicht.

Zur Induktion wurde den Ratten an vier aufeinanderfolgenden Tagen je 75 mg/kg Phenobarbital/Na (Luminal^{R}) ip. verabreicht. Bis zum Versuchsbeginn wurde eine Pause von drei Tagen eingehalten. Dadurch war sichergestellt, daß bei Gabe der Pentobarbital- bzw. Vinylbitalum-Isomere kein Phenobarbital mehr erfaßbar war.

Zur Prüfung der narkotischen Wirksamkeit wurde die Zeit vom Beginn der Injektion bis zur Toleranz der Seitenlage (= Einschlafzeit) und die Dauer der Seitenlage (= Schlafdauer) gemessen.

Zum Studium der Verteilung und der metabolischen Elimination wurde die Barbituratkonzentration nach Gabe der optischen Isomere in Serum, Gehirn und

Leber bei nicht induzierten und bei induzierten Ratten bestimmt. Hierzu wurde das Organmaterial (Gehirn und Leber) nach Entbluten durch Herzpunktion entnommen, gewogen und bei -30°C bis zur Analyse eingefroren. Das Serum wurde nach kurzem Stehenlassen des Blutes durch scharfes Zentrifugieren (5 Minuten) gewonnen und sofort der weiteren Analyse zugeführt.

2. Isolierung der Barbiturate

a) Von dem Serum wurden jeweils bis zu 2,0 ml mit 1/15 m Phosphatpuffer auf ein Volumen von 3,5 ml aufgefüllt und in 25 ml fassenden Schliffreagenzgläsern zweimal mit je 10 ml Äther extrahiert. Die vereinigten Ätherphasen wurden in 50 ml fassenden Zentrifugengläsern (Ø 3o mm) bei 40°C im Wasserbad abgedampft. Der Rückstand wurde in einem Gemisch aus Aceton und Äther (1 : 1) gelöst und quantitativ auf die Dünnschichtplatte aufgetragen.

b) Das gesamte Gehirn bzw. 1,5 - 2 g Leber wurden mit 7,0 ml o,2 m Trispuffer (pH 8,o) in der Kälte

homogenisiert und 15 Minuten bei 20000 g zentrifugiert. Das Sediment wurde erneut mit 7 ml Trispuffer aufgeschüttelt und anschließend wieder wie beschrieben sedimentiert. Nach Ansäuern der vereinigten Überstände mit 0,2 ml 5 n HCl erfolgte die Extraktion mit Chloroform (2 mal je 50 ml). Die vereinigten Chloroformphasen wurden durch Papierfilter in Rundkolben übergeführt und anschließend im Wasserstrahlvakuum bei 40°C (Rotationsverdampfer Büchi) abgedampft. Aus den Rundkolben wurden die Rückstände mit 3 mal 3 ml Äther in Reagenzgläser übergeführt. Nach Abdampfen des Äthers bei 40°C im Wasserbad wurde der verbleibende Rückstand in 0,3 ml Methanol gelöst und das Reagenzglas verschlossen. 0,1 bzw. 0,15 ml dieser Lösung wurden quantitativ auf die Dünnschichtplatte aufgetragen.

3. Chromatographie und Nachweis

Die zur Chromatographie verwendeten Dünnschichtplatten wurden nach der Methode von STAHL hergestellt und aufbewahrt (15). Als stationäre Phase diente Kieselgel GF_{254}, das mit einer Schichtdicke von 0,25 mm auf

die Platten aufgestrichen wurde. Die Chromatographie erfolgte aufsteigend mit iso-Propanol/Chloroform/ 33 % Ammoniaklösung (70+20+10) als Fließmittel. Als Referenzsubstanzen wurden aus 0,2 % methanolischen Lösungen 20-40 ug Pentobarbital bzw. Vinylbitalum auf die Dünnschichtplatte gebracht. Die gelösten Extraktions-Rückstände wurden bandförmig, auf mehrere Startpunkte verteilt, aufgetragen. Die Laufstrecke betrug im Durchschnitt 10 cm und war nach 70 min. zurückgelegt. Beide Barbiturate können im UV-Licht (Mineralight^{R}, Ultraviolet Products, Inc.) auf der fluoreszierenden Dünnschichtplatte als dunkle Flecken erkannt und anhand der Referenzsubstanzen identifiziert werden.

Der R_f-Wert beträgt für Pentobarbital 0,75 und für Vinylbitalum 0,78. Die Analyse der Serum-, Gehirn- und Leberextrakte von Tieren, die keine Barbiturate erhalten hatten, ergab, daß durch die Bestimmung im UV-Licht eventuell störende Begleitstoffe mit Sicherheit durch die Dünnschichtchromatographie abgetrennt werden.

4. Bestimmung

Hierzu wurden die im UV-Licht durch Umranden gekennzeichneten Kieselgelzonen, welche die Barbiturate enthielten, von der Dünnschichtplatte abgelöst und das Kieselgel in 15 ml fassende Zentrifugenröhrchen übergeführt. Nach Zugabe von 4,0 ml 0,1 n NaOH wurden die Röhrchen verschlossen und drei Minuten mechanisch geschüttelt. Durch kurzes, scharfes Zentrifugieren wurde das Kieselgel wieder sedimentiert und gegen einen auf die gleiche Weise gewonnenen Plattenleerwert mit Hilfe eines Spektralphotometers (PQM II, Zeiss) in Quarzküvetten (d = 1,0 cm) gemessen. Die Bestimmung der Extinktion erfolgte im UV-Absorptionsmaximum für Pentobarbital bei 240 mu und für Vinylbitalum bei 248 mu.

Zur Aufstellung der Eichkurven nach Extraktion aus Serum wurden ansteigende Mengen von Pentobarbital bzw. Vinylbitalum dem Serum beigemischt. Hierzu wurden jeweils 1,5 ml Rattenserum 0,1 (= 40 ug), 0,2 (= 80 ug) .... 0,5 (= 200 ug) der betreffenden

0,04 % Barbituratlösung beigemischt und die Ansätze mit 1/15 m Phosphatpuffer (pH 5,0) ad 3,5 ml aufgefüllt.

Die weitere Analyse erfolgte wie bei "Isolierung der Barbiturate a)" beschrieben.

Die für Pentobarbital und Vinylbitalum erhaltenen Eichkurven sind linear und gehen durch den Nullpunkt. Die Bestimmbarkeitsgrenze liegt, sofern für die Extraktion 2 ml Serum zur Verfügung standen, bei 10 ug/ml Serum. Anhand von Mehrfachbestimmung derselben Barbituratmenge ergibt sich eine durch die Prozedur bedingte Streuung von ca. 4 %.

Zur Aufstellung der Eichkurven nach Extraktion aus Gehirn bzw. Leber wurden ebenfalls ansteigende Mengen der beiden Barbiturate den Gewebshomogenaten beigemischt. Die Analyse und Bestimmung wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Die auf diese Weise erhaltenen Eichkurven sind ebenfalls linear und gehen durch den Nullpunkt. Die Bestimmbarkeitsgrenze liegt bei 15 ug/g und die Streuung bei ca. 4-6 %.

III. ERGEBNISSE

A. Untersuchungen mit Pentobarbital

1. Narkotische Wirksamkeit.

Nach iv. Applikation von 25 mg/kg (+)- bzw. (-)-Pentobarbital an weibliche Wistar-Ratten ergeben sich hinsichtlich der narkotischen Wirksamkeit große Unterschiede zwischen den Isomeren (Abb. 2 bzw. Tab. 1a). Die Tiere, denen (-)-Pentobarbital gegeben wurde, nehmen sofort, die anderen jedoch, denen der (+)-Antipode verabreicht wurde, erst nach 180 sec. Seitenlage ein. Ebenso deutlich ist der Unterschied in der Schlafdauer, die bei (-)- fast 4 Stunden, bei (+)-Pentobarbital jedoch nur knapp 1 Stunde anhält.

(+)- und (-)-Pentobarbital, die bei der Racematspaltung mit weniger hohem Reinheitsgrad angefallen waren, ergaben hinsichtlich der narkotischen Wirksamkeit bei gleicher Dosierung, der Erwartung entsprechend, etwas kleinere Unterschiede (Abb. 2 bzw. Tab. 1b): Beim (+)-Isomeren wurde eine Verkürzung der Einschlafzeit und eine Verlängerung

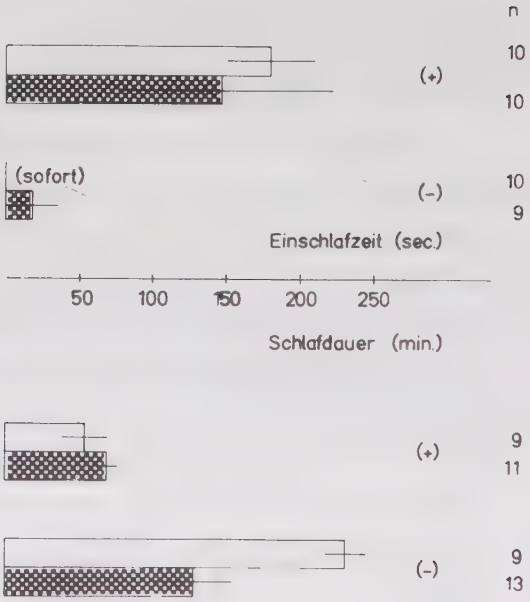


Abb. 2: Einschlafzeit* und Schlafdauer* nach iv. 25 mg/kg (+)- bzw. (-)-Pentobarbital.

□ α^{24}_{589} + 7,8° bzw. - 10,6°

▩ α^{20}_{578} + 4,2° bzw. - 4,4°

Signifikanz siehe Tab. 1a bzw. 1b.

---

* Definition siehe Methodik.

der Schlafdauer festgestellt. Beim (-)-Isomeren ergab die Messung umgekehrt bei einem Teil der Tiere nun meßbare Einschlafzeiten und eine um nahezu die Hälfte verkürzte Schlafdauer.

2. Verteilung der optischen Antipoden des Pentobarbitals in Serum, Gehirn und Leber bei nicht induzierten Ratten.

Es war von Interesse zu wissen, ob auch hinsichtlich der Verteilung in verschiedenen Geweben ähnlich große Unterschiede zwischen den Isomeren des Pentobarbitals vorhanden sind. Diese Messungen wurden nach iv. Verabreichung von 50 mg/kg (+)- bzw. (-)-Pentobarbital (höherer Reinheitsgrad) durchgeführt. Die nach 3 Minuten in Serum, Gehirn und Leber gemessenen Konzentrationen der Pentobarbital-Antipoden sind in Tab. 2a bzw. Abb. 3 wiedergegeben. Bereits so kurze Zeit nach der Injektion ist Pentobarbital in Gehirn und Leber gegenüber der Konzentration im Serum angereichert. Sowohl im Serum als auch in Gehirn und Leber liegt die Pentobarbital-Konzentration nach Applikation des (-)-Antipoden deutlich tiefer als nach Applikation der (+)-Verbindung.

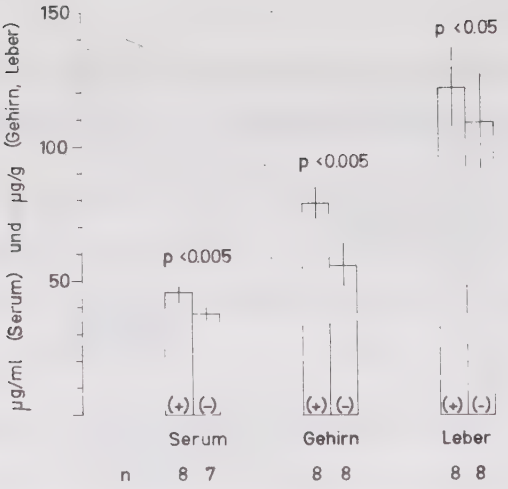


Abb. 3: Pentobarbital-Konzentration in Serum, Gehirn und Leber 3 Minuten nach iv. 50 mg/kg des (+)- bzw. (-)-Isomeren.

$[\alpha]_{589}^{24}$ + 7,8° bzw. -10,6°

Auch hier wurden Untersuchungen mit Pentobarbital-Antipoden durchgeführt, die einen weniger hohen Reinheitsgrad besaßen (Tab. 2b). Die gemessenen Konzentrationen in Serum, Gehirn und Leber unterscheiden sich überraschenderweise nur unwesentlich von denen der entsprechenden Isomere höheren Reinheitsgrades. Die Pentobarbital-Konzentrationen liegen nach Gabe des (-)-Isomeren, mit Ausnahme derjenigen für das Serum, ebenfalls eindeutig tiefer als nach Gabe der (+)-Verbindung.

20 Minuten später (Abb. 4 bzw. Tab. 3a) ist die Pentobarbital-Konzentration im Serum nach Gabe der Isomere gleich hoch. Im Gehirn wird zu diesem Zeitpunkt die Pentobarbital-Konzentration nach Applikation des (-)-Isomeren geringfügig höher gefunden als nach Gabe der (+)-Verbindung. In der Leber überwiegt wie zum frühen Zeitpunkt die Konzentration der (+)-Verbindung.

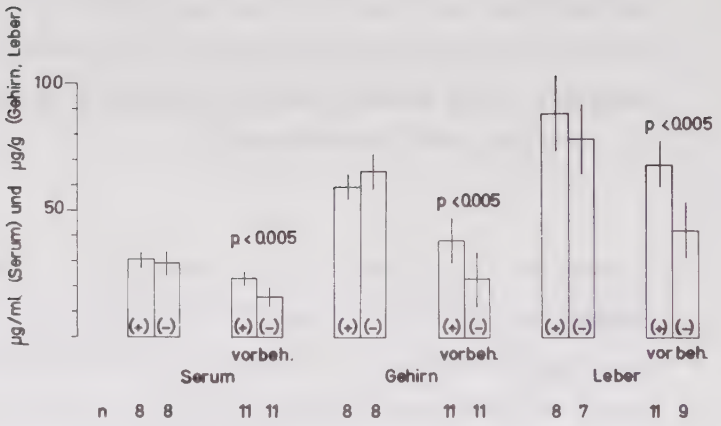


Abb. 4: Pentobarbital-Konzentration in Serum, Gehirn und Leber 20 Minuten nach iv. 50 mg/kg des (+)- bzw. (-)-Isomeren bei nicht induzierten und induzierten (vorbeh.) Tieren.
Induktion: siehe Methodik.

3. Verteilung der optischen Antipoden des Pentobarbitals in Serum, Gehirn und Leber bei induzierten Ratten.

Zur Beurteilung der Frage, welcher der beiden Antipoden des Pentobarbitals rascher metabolisch eliminiert wird, diente die Bestimmung der Gewebsverteilung der Isomere nach Vorbehandlung mit Phenobarbital (Abb. 4 vorbeh. bzw. Tab. 3b). Der Vergleich dieser Meßdaten mit denen, die man zum gleichen Zeitpunkt (20 Minuten) bei nicht induzierten Tieren erhält, läßt eine Beantwortung dieser Frage zu.
Die durch Phenobarbital-Vorbehandlung bewirkte Aktivierung der mikrosomalen Hydroxylasen (16, 17, 18, 19, 20) hat für beide Isomere des Pentobarbitals eine Beschleunigung der Elimination zur Folge. Der Vergleich der Pentobarbital-Konzentration im Serum induzierter mit derjenigen nicht induzierter Ratten ergibt für das (+)-Isomere eine durch die Induktion bedingte Senkung des Serumspiegels um 25 %. Für das (-)-Isomere hingegen beträgt sie rund 45 %.

Die Pentobarbital-Konzentration im Gehirn wird durch die Vorbehandlung mit Phenobarbital ebenfalls

entsprechend beeinflußt. Die Konzentrationsabnahme im Gehirn beträgt nach Gabe des (+)- 35 %, nach Verabfolgung des (-)-Pentobarbitals jedoch 65 %.

Für die Leber ist die durch Induktion hervorgerufene Senkung der Pentobarbital-Konzentration bei (-)- mit 46 % sogar rund doppelt so hoch wie beim (+)-Isomeren (23 %), d.h. daß die (+)-Verbindung sehr viel langsamer metabolisch inaktiviert wird.

B. Untersuchungen mit Vinylbitalum

1. Narkotische Wirksamkeit.

Nach iv. Gabe von 25 mg/kg Vinylbitalum sind in Analogie zu den Versuchen mit Pentobarbital deutliche Unterschiede für Einschlafzeit und Schlafdauer zwischen den Isomeren zu beobachten (Tab. 4 bzw. Abb. 5).

2. Verteilung der optischen Antipoden des Vinylbitalums in Serum, Gehirn und Leber bei nicht induzierten Ratten.

Die drei Minuten nach iv. Applikation von 50 mg/kg (+)- bzw. (-)-Vinylbitalum gemessenen Gewebskonzentrationen sind in Tab. 5a bzw. Abb. 6 wiedergegeben. Im Gegensatz zu den Versuchen mit Pentobarbital sind die Vinylbitalum-Konzentrationen nach Gabe des (+)-Isomeren nicht von denjenigen nach Gabe der (-)-Verbindung verschieden. Außerdem ist weder nach Applikation von (+)- noch nach Gabe von (-)-Vinylbitalum eine Anreicherung im Gehirn zu beobachten. Nach Verabreichung beider Isomere wird analog zu den Versuchen mit Pentobarbital eine Vinylbitalum-Anreicherung in der Leber beobachtet.

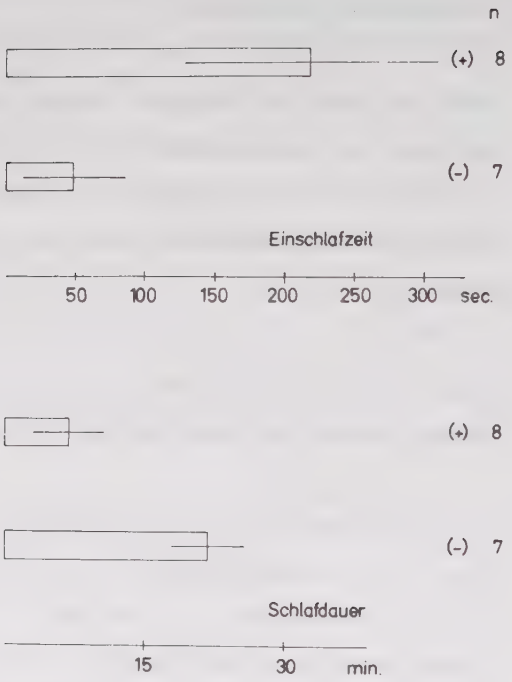


Abb. 5: Einschlafzeit* und Schlafdauer* nach iv. 25 mg/kg (+)- bzw. (-)-Vinylbitalum.
$[\alpha]_{578}^{20}$ + 7,2° bzw. - 13,2°
Signifikanz siehe Tab. 4.

* Definition siehe Methodik.

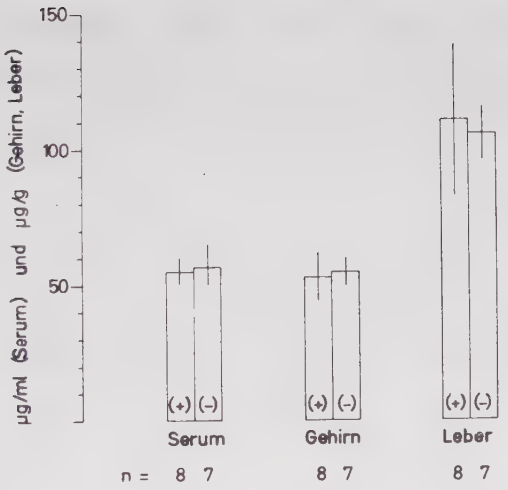


Abb. 6: Vinylbitalum-Konzentration in Serum, Gehirn und Leber 3 Minuten nach iv. 50 mg/kg des (+)- bzw. (-)-Isomeren

$[\alpha]_{578}^{20}$ + 7,2° bzw. - 13,2°

Auch 20 Minuten später (Tab. 5b bzw. Abb. 7) sind die Konzentrationen der beiden Antipoden des Vinylbitalums in Serum und Gehirn gleich hoch. In der Leber überwiegt zu diesem Zeitpunkt die Konzentration der (-)-Verbindung. Im Vergleich zum 3-Minuten-Wert ist nur in Serum und Leber die Vinylbitalum-Konzentration nach Applikation beider Isomere abgefallen. Im Gehirn hingegen sind die Konzentrationen gegenüber dem frühen Zeitpunkt nicht gesunken.

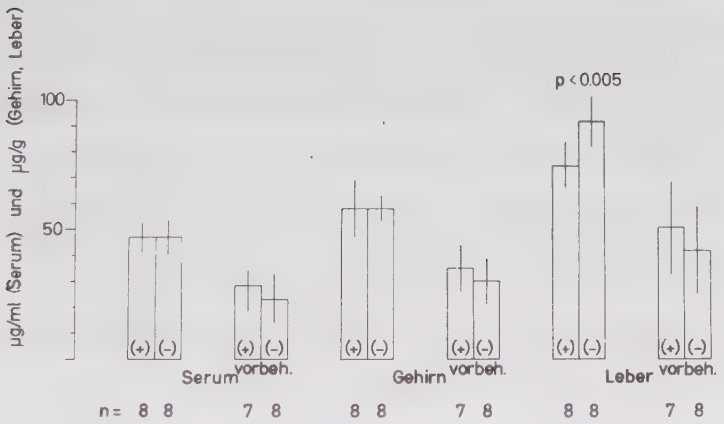


Abb. 7: Vinylbitalum-Konzentration in Serum, Gehirn und Leber 20 Minuten nach iv. 50 mg/kg des (+)- bzw. (-)-Isomeren bei nicht induzierten und induzierten (vorbeh.) Ratten. Induktion: siehe methodischer Teil.

3. Verteilung der optischen Antipoden des Vinylbitalums in Serum, Gehirn und Leber bei induzierten Ratten.

Auch hier wurde der Vergleich der Gewebskonzentrationen induzierter und nicht induzierter Tiere (siehe Versuchsergebnisse Pentobarbital) zur Beantwortung der Frage herangezogen, welcher der beiden Antipoden rascher metabolisch eliminiert wird (s. Tab. 5b bzw. c und Abb. 7, - vorbeh.). Gegenüber nicht induzierten Ratten ist die Konzentration des (+)-Isomeren im Serum um 4o %, die des (-)-Isomeren um 50 % niedriger. Auch in Gehirn und Leber ist durch die Vorbehandlung mit Phenobarbital die Pentobarbital-Konzentration nach Gabe der (-)-Verbindung etwas stärker abgesunken (um 48 % für (-)- gegenüber 40 % für (+)- im Gehirn bzw. um 54 % für (-)- gegenüber 32 % für (+)- in der Leber). Somit ist festzustellen, daß auch beim Vinylbitalum die (-)-Verbindung - wenngleich weniger - bevorzugt metabolisch inaktiviert wird.

IV. DISKUSSION

Vorausgehende Untersuchungen mit den optischen Antipoden des Hexobarbitals (10, 11) und Methylphenobarbitals (12, 13), zwei im Ring asymmetrischen Barbituraten, hatten ergeben, daß zwischen den jeweiligen Isomeren dieser Barbiturate hinsichtlich narkotischer Wirksamkeit, Verteilung und metabolischer Elimination beträchtliche Unterschiede bestehen. Die mit Pentobarbital (21) und Vinylbitalum in gleicher Weise durchgeführten Versuche zeigen nunmehr bei Barbituraten, die wegen Asymmetrie in einer Seitenkette optisch aktiv sind, daß in beiden Fällen die (-)-Form die narkotisch wirksamere ist. Treten solche Unterschiede in der biologischen Wirksamkeit der optischen Isomeren einer Substanz auf, dann wird dies allgemein auf die verschiedengradige sterische Entsprechung zwischen den Wirkstoff-Molekülen und den in Frage kommenden Rezeptoren zurückgeführt (BECKETT, 22). Da eine unmittelbare Untersuchung der Substrat-Rezeptor-Beziehung naturgemäß vorerst nicht möglich ist, kommt dem Studium von Verteilung und enzymatischen Oxydation der Antipoden der seitenkettenaktiven Barbitursäuren besondere Bedeutung zu.

Durch eine solche Messung der Verteilung und der metabolischen Inaktivierung lassen sich Informationen über die eventuelle Bevorzugung eines der Isomere gewinnen, die einerseits dazu beitragen, deren unterschiedliche Wirkung zu verstehen, und andererseits helfen, Fehlinterpretationen zu vermeiden.

Für die Beurteilung, welcher der beiden Antipoden eines Barbiturates rascher metabolisch inaktiviert wird, wurde hier der Vergleich zwischen induzierten und nicht induzierten Tieren herangezogen. Die Induktion wurde durch Vorbehandlung mit Phenobarbital vorgenommen. Es ist bekannt, daß dadurch eine Reihe von enzymatischen Reaktionen, die für die metabolische Umwandlung von Fremdstoffen verantwortlich sind, aktiviert wird (16, 17, 18, 19, 20). Infolge einer derartigen Aktivitätssteigerung der im endoplasmatischen Retikulum der Leber lokalisierten Enzyme werden nachfolgend verabreichte Fremdstoffe rascher metabolisch umgewandelt. Dieser Umstand ermöglicht beim Pentobarbital und beim Vinylbitalum, deren metabolische Elimination beim nicht vorbehandelten Tier nur langsam abläuft, nach Induktion eine

Aussage über die verschiedengradige Metabolisierbarkeit.

Nimmt man das Verhalten der Barbiturat-Konzentration in der Leber als Maß für die Auswirkung der Induktion, dann ist festzustellen, daß bei beiden Barbituraten nach Vorbehandlung mit Phenobarbital jeweils die (-)-Verbindung rascher metabolisch eliminiert wird.

Der Vergleich der narkotischen Wirksamkeit und der Konzentration im Gehirn bei den optischen Antipoden des Pentobarbitals in Analogie zum Methylphenobarbital (13, 14) zeigt, daß zwischen höherer Anreicherung im Gehirn (betrifft bei beiden Barbituraten die (+)-Verbindung) und stärkerer narkotischer Wirksamkeit (gilt in beiden Fällen für die (-)-Verbindung) keine Korrelation besteht (s. Tab. 6).

Vergleicht man hingegen die mit den Isomeren des Pentobarbitals erhaltenen Resultate mit denjenigen des Hexobarbitals (11, 12), so kann man hinsichtlich der metabolischen Inaktivierung beim Pentobarbital

eine Bevorzugung der (-)- und beim Hexobarbital eine Bevorzugung der (+)-Verbindung feststellen. Bei beiden Barbituraten wird somit jeweils der narkotisch wirksamere Antipode auch rascher metabolisch inaktiviert. Beim Methylphenobarbital dagegen ist es umgekehrt (13, 14). Hier ist die narkotisch wirksamere Form auch gleichzeitig die Verbindung, die metabolisch langsamer inaktiviert wird. Dieser zuletzt genannte Befund würde bei oberflächlicher Betrachtung und ohne Kenntnis der beim Pentobarbital bzw. Hexobarbital fehlenden Korrelation zu dem Trugschluß geführt haben, daß stärkere narkotische Wirksamkeit und verlangsamte metabolische Inaktivierung kausal zusammenhängen.

In Abhängigkeit vom Reinheitsgrad nimmt beim Pentobarbital die narkotische Wirkungsstärke der (-)-Verbindung zu, die der (+)- dagegen ab (Tab. 1). Während so die verschiedengradig optisch reinen Isomere des Pentobarbitals deutlich unterschiedlich narkotisch wirksam sind, lassen sich solche Unterschiede in der Gewebsverteilung nicht nachweisen (Tab. 2). Offenbar sind die für die Narkose verant-

wortlichen Rezeptoren in den Membranen der Synapsen des ZNS ein empfindlicherer Indikator gegenüber Unterschieden im sterischen Reinheitsgrad als die Bestimmung der Verteilung, bei der sich verschiedene Interferenzen auswirken.

Auch beim Vinylbitalum, das im Vergleich zum Pentobarbital an Stelle der Aethyl- eine Vinylgruppe neben dem Methylbutyl-Rest als weitere Seitenkette hat, wirkt die (-)-Verbindung deutlich stärker narkotisch. In diesem Zusammenhang ist der von KNABE und Mitarb. (23) erhobene Befund, daß (-)-Pentobarbital und (-)-Vinylbitalum die gleiche absolute Konfiguration haben, von besonderem Interesse, weil hiermit erstmals eine Korrelation zwischen sterischer Konfiguration und biologischer Wirksamkeit bei Barbituraten nachgewiesen wurde.

Überraschenderweise ergab das Studium der Gewebsverteilung beim Vinylbitalum, mit Ausnahme des 20-Minuten-Wertes bei der Vinylbitalum-Konzentration in der Leber, keine Unterschiede zwischen den Isomeren.

Da (+)-Vinylbitalum und (+)-Pentobarbital bzw. (-)-Vinylbitalum und (-)-Pentobarbital sterisch gleich sind (23), so ist demnach die Vinylgruppe dafür verantwortlich, daß Vinylbitalum im Gegensatz zum Pentobarbital im Gehirn nicht angereichert wird und gleichfalls dafür verantwortlich, daß kein Unterschied mehr zwischen den Antipoden hinsichtlich der Verteilung besteht. Auch der zur Prüfung der metabolischen Inaktivierung durchgeführte Vergleich zwischen induzierten und nicht induzierten Tieren zeigte mit Ausnahme der Leber nur geringfügige, statistisch nicht zu sichernde, Konzentrationsunterschiede, die analog zum Pentobarbital auf eine raschere Elimination des (-)-Vinylbitalums hinweisen. Auffällig ist allerdings der narkotische Wirkungsunterschied zwischen den beiden Barbituraten: Vergleicht man bei gleicher Dosierung und Applikationsweise die Dauer der Seitenlage nach Gabe der entsprechenden Isomere beider Barbiturate (beim Pentobarbital die optisch reinere Form), so ergibt sich beim (-)-Pentobarbital eine Zunahme der narko-

tischen Wirksamkeit um Faktor 10 und beim (+)-Pentobarbital eine solche um Faktor 8.

Unabhängig von den geringfügigen Verteilungsunterschieden beim Vinylbitalum hat der Vergleich zwischen seitenkettenaktiven und im Ring asymmetrischen Barbituraten somit folgendes ergeben:

1. Die bei den seitenkettenaktiven Barbituraten Pentobarbital und Vinylbitalum narkotisch wirksameren (-)-Antipoden werden auch rascher metabolisch inaktiviert. Analog verhält es sich mit dem im Ring asymmetrischen Hexobarbital, bei dem jedoch das (+)-Isomere das narkotisch wirksamere ist, das außerdem metabolisch rascher inaktiviert wird. Nur bei Methylphenobarbital wird der narkotisch wirksamere (-)-Antipode auch langsamer metabolisch eliminiert.

2. Beim Hexobarbital wird die narkotisch wirksamere (+)-Verbindung auch gleichzeitig im Gehirn gegenüber der Serumkonzentration stärker ange-

reichert als das (-)-Isomere. Ein derartiger Zusammenhang zwischen narkotischer Wirksamkeit und stärkerer Anreicherung im Gehirn ist weder beim Methylphenobarbital noch bei den seitenkettenaktiven Barbituraten Pentobarbital und Vinylbitalum zu finden.

3. Das (+)-Isomere wird sowohl bei den im Ring asymmetrischen Barbituraten (Hexobarbital und Methylphenobarbital) als auch bei dem seitenkettenaktiven Pentobarbital im Gehirn stärker angereichert; eine Ausnahme davon ist Vinylbitalum, bei dem die Konzentration zwischen Serum und Gehirn gleich hoch gefunden wurde; jedoch geht bei der zuerst genannten Gruppe die metabolische Inaktivierung des jeweiligen (+)-Isomeren, bei der zuletzt genannten jedoch die des jeweiligen (-)-Isomeren schneller vor sich.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die Verabreichung von (+)- und (-)-Pentobarbital bzw. (+)- und (-)-Vinylbitalum an Ratten ergab bei beiden Barbituraten, daß der (-)-Antipode der narkotisch wirksamere ist. Gemessen an der Schlafdauer ist sowohl beim Pentobarbital als auch beim Vinylbitalum das (-)-Isomere um mehr als einen Faktor 3 wirksamer als der (+)-Antipode, was besonders im Hinblick auf die in diesem Fall bekannte gleiche absolute Konfiguration der (-)-Verbindungen interessant ist. Verteilungsstudien ergaben nur zwischen (+)- und (-)-Pentobarbital deutliche Unterschiede in der Barbiturat-Konzentration pro ml Serum, bzw. pro g Gehirn und g Leber Frischgewicht. Überraschenderweise war in Serum, Gehirn und Leber die Pentobarbital-Konzentration nach Gabe der schwächer wirksamen (+)-Verbindung am höchsten. Nach Gabe beider Antipoden war die Pentobarbital-Konzentration in Gehirn und Leber gegenüber derjenigen im Serum höher. Beim Vinylbitalum konnte eine solche Anreicherung für beide Antipoden nur in der Leber be-

obachtet werden.

Eine Vorbehandlung der Ratten mit Phenobarbital, wie sie üblicherweise zur Induktion arzneimittelabbauender Enzyme vorgenommen wird, führte bei beiden Barbituraten, gemessen am Verschwinden des Ausgangsproduktes in den verschiedenen Geweben, zu einer Beschleunigung der metabolischen Elimination. Während beim Pentobarbital die (-)-Verbindung signifikant rascher aus Serum, Gehirn und Leber metabolisch eliminiert wird, war ein analoger Befund beim Vinylbitalum nur für die Leber nachweisbar.

VI. LITERATUR

1. KNABE, J. und R. KRÄUTER

Spaltung von Hexobarbital (Evipan^{R}) in optische Antipoden.

Arch.Pharmaz. 298, 1 (1965)

---

2. KNABE, J. und K. PHILIPSON

Spaltung einiger racemischer Barbitale in optische Antipoden.

Arch.Pharmaz. 299, 231 (1966)

---

3. KNABE, J. und D. STRAUSS

Synthese beider Hexobarbital-Antipoden sowie von (+)-Thiohexobarbital aus (+)-cyclohexenyl-methyl-cyanessigsäure - methylester.

Angew. Chemie 80, 483 (1968)

---

4. KNABE, J., D. STRAUSS und C. URBAN

Die optischen Antipoden von 5-aethyl-5-nor-hexobarbital.

Im Druck.

---

5. HSUEH, C.M. and C.S. MARVEL

Optically active hypnotics

J.Amer.chem.soc. 50, 855 (1928)

---

6. KLEIDERER, E.C. and H.A. SHONLE

Studies on some optically active barbituric acids.

J.Amer.chem.soc. 56, 1772 (1934)

---

7. GIBSON, W.R., W.J. DORAN, W.C. WOOD and E.E. SWANSON

Pharmacology of stereoisomere of 1-methyl-5-(1-methyl-2-pentynyl)-5-allyl-barbituric acid.

J. Pharmacol.exp.Ther. 125, 23 (1959)

---

8. BÜCH, H. und W. BUZELLO

Unveröffentlichte Befunde.

---

9. WAHLSTRÖM, G.

Differences in anaesthetic properties between the optical antipodes of hexobarbital in the rat.

Life Sciences 5, 1781 (1966)

---

10. HOFFMEISTER, F.

Farbenfabriken Bayer AG, Elberfeld,

persönliche Mitteilung (1966)

---

11. RUMMEL, W., U. BRANDENBURGER und H. BÜCH

Versuche zur Aufklärung der Ursachen der unterschiedlichen narkotischen Wirksamkeit von (+)- und (-)-Hexobarbital.

Med. Pharmacol. exp. 16, 496 (1967)

---

12. BRANDENBURGER, U.

Versuche zur Aufklärung der Ursachen der unterschiedlichen narkotischen Wirksamkeit von (+)- und (-)-Hexobarbital.

Dissertation der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes (1967)

---

13. BÜCH, H., W. RUMMEL, W. BUZELLO und O. NEUROHR

Verteilung, metabolische Elimination und narkotische Wirksamkeit der optischen Antipoden von Methylphenobarbital.

Arch.Pharmak. exp. Path. 260, 99 (1968)

---

14. BÜCH, H., W. BUZELLO, O. NEUROHR und W. RUMMEL

Vergleich von Verteilung, narkotischer Wirksamkeit und metabolischer Elimination der optischen Antipoden von Methylphenobarbital.

J. Biochemical Pharmacology (in Druck)

---

15. STAHL, E.

Dünnschichtchromatographie, Seite 7 - 1o.

Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1962)

---

16. REMMER, H.

Der beschleunigte Abbau von Pharmaka in den Lebermicrosomen unter dem Einfluß von Luminal.

Arch.Exp.pathol.Pharmakol. 235, 279-29o (1959)

---

17. REMMER, H.

Die Beschleunigung der Evipanoxydation und der Demethylierung von Methylaminoantipyrine durch Barbiturate.

Arch.Exp.pathol.Pharmakol. 237, 296 - 3o7 (1959)

---

18. CONNEY, A.H., C. DAVISON, R. GASTEL and J.J. BURNS

Adaptive increases in drug-metabolizing enzymes induced by phenobarbital and other drugs.

J. Pharmacol. Exp.Therap. 13o, 1-8 (196o)

---

19. CONNEY, A.H. and A. KLUTCH

Increased activity of androgen hydroxylases in liver microsomes of rats pretreated with phenobarbital and other drugs.

J. Biol.Chem. 238, 1611 - 1617 (1963)

2o. CONNEY, A.H., J.A. MICHAELSON and J.J. BURNS

Stimulatory effect of chlorcyclizine on barbiturate metabolism.

---

21. BÜCH, H., W. GRUND, W. BUZELLO und W. RUMMEL

Narkotische Wirksamkeit und Gewebsverteilung der optischen Antipoden des Pentobarbitals bei der Ratte.

J. Biochemical Pharmacology (in Druck)

---

22. BECKETT, A.H.

Stereochemical Factors in Biological Activity.

Fortschr.d.Arzneimittelforsch. (E. Jucker, Ed.) Vol I, p. 455, Birkhäuser Verlag, Basel und Stuttgart (1959)

---

23. KNABE, J. und W. GEISMAR

Barbitursäurederivate. 4. Mitt.: Die relative Konfiguration von opt. aktivem Pentobarbital, Vinylbital und Thiopental.

VII. TABELLEN - ANHANG

a)	optische Drehung $[\alpha]^{24}_{589}$	+ 7,8°	- 10,6°
	Einschlafzeit* (sec)	180 ± 30	sofort
	Schlafdauer** (min)	54 ± 15^{x} p < 0,001	232 ± 14^{xx}
	n	6	6
b)	optische Drehung $[\alpha]^{20}_{578}$	+ 4,2°	- 4,4°
	Einschlafzeit* (sec)	147 ± 70 p < 0,001	18 ± 18
	Schlafdauer ** (min)	69 ± 7^{x} p < 0,001	128 ± 27^{xx}
	n	11	13

Tab. 1: Narkotische Wirksamkeit der Pentobarbital-Isomeren nach 25 mg/kg iv.

*) = Zeit vom Beginn der Injektion bis zum Verlust der Stell- und Haltereflexe
**)= Dauer der Seitenlage
x) = Die Unterschiede bei der Einschlafzeit zwischen den zugehörigen Isomeren verschiedenen Reinheitsgrades sind mit p-Wert 0,05 statistisch gesichert.
xx)= Entsprechende Unterschiede bei der Schlafdauer p 0,001

a)

[α]$^{24}_{589}$	Serum ug/ml	Gehirn ug/g	Leber ug/g
+ 7,8°	46 ± 3 n = 8	79 ± 6 n = 8	122 ± 15 n = 8
- 10,6°	38 ± 3 n = 7	56 ± 8 n = 7	1o9 ± 18 n = 7
p (+) : (-)	< 0,005	< 0,005	< 0,05

b)

[α]$^{2o}_{578}$	Serum ug/ml	Gehirn ug/g	Leber ug/g
+ 4,2°	45 ± 4 n = 8	74 ± 14 n = 8	148 ± 29 n = 8
- 4,4°	43 ± 4 n = 8	49 ± 1o n = 8	122 ± 2o n = 8
p (+) : (-)		< 0,005	< 0,05

Tabelle 2: Pentobarbital - Konzentration in Serum, Gehirn und Leber 3 Minuten nach iv. Verabreichung von 5o mg/kg der Pentobarbital-Isomeren.
a = höherer Reinheitsgrad
b = niedrigerer Reinheitsgrad

	$[\alpha]_{589}^{24}$	Serum ug/ml	Gehirn ug/g	Leber ug/g
a)	(+)	31 ± 3 n = 8	59 ± 5 n = 8	88 ± 15 n = 7
	(-)	29 ± 5 n = 8	65 ± 7 n = 8	78 ± 14 n = 8
	p (+) : (-)	-	-	-
b)	(+)	23 ± 3 n = 11	38 ± 9 n = 11	68 ± 9 n = 11
	(-)	16 ± 4 n = 11	23 ± 11 n = 11	42 ± 11 n = 10
	p (+) : (-)	< 0,005	< 0,005	< 0,005

Tabelle 3: Pentobarbital - Konzentration in Serum, Gehirn und Leber 20 Minuten nach iv. Injektion von 5o mg/kg der Pentobarbital-Isomeren höheren Reinheitsgrades bei nicht induzierten (= a) und induzierten (= b).
Induktion: s. methodischer Teil.

optische Drehung $[\alpha]_{578}^{20}$		+ 7,2°	- 13,2°
Einschlafzeit*	(sec)	219 ± 91 p < 0,05	49 ± 37
Schlafdauer**	(min)	7 ± 4 p < 0,001	22 ± 4
n		8	7

Tabelle 4: Narkotische Wirksamkeit der Vinylbitalum-Isomeren nach 25 mg/kg iv.
*) = Zeit vom Beginn der Injektion bis zum Verlust der Stell- und Haltereflexe
**) = Dauer der Seitenlage

a)

3 min.	Serum ug/ml	Gehirn ug/g	Leber ug/g
(+)	55 ± 5 n = 8	53 ± 9 n = 8	111 ± 28 n = 8
(-)	57 ± 7 n = 7	55 ± 5 n = 7	1o6 ± 1o n = 7
p (+) : (-)	-	-	-

b)

2o min.	Serum ug/ml	Gehirn ug/g	Leber ug/g
(+)	47 ± 6 n = 8	58 ± 11 n = 8	75 ± 9 n = 8
(-)	47 ± 7 n = 8	58 ± 5 n = 8	92 ± 1o n = 8
p (+) : (-)	-	-	< 0,005

c)

2o min. induz.	Serum ug/ml	Gehirn ug/g	Leber ug/g
(+)	28 ± 1o n = 7	35 ± 9 n = 7	51 ± 18 n = 7
(-)	23 ± 9 n = 8	3o ± 9 n = 8	42 ± 17 n = 8
p (+) : (-)	-	-	-

Tabelle 5: Konzentration der Vinylbitalum-Antipoden in Serum, Gehirn und Leber 3 bzw. 2o Minuten nach iv.-Injektion von 5o mg/kg Vinylbitalum bei nicht induzierten (a + b) und induzierten Tieren (c).
Induktion: s. methodischer Teil

	Barbiturate	optische Drehung	Narkotische Wirksamkeit	höhere Anreicherung im Gehirn	Metabolische Inaktivierung
**	Hexobarbital	(+)	wirksamer	bezogen auf d. Serumkonz.	rascher
		(-)	-	-	-
**	Methylphenobarbital	(+)	-	absolut	rascher
		(-)	wirksamer	-	-
*	Pentobarbital	(+)	-	absolut	-
		(-)	wirksamer	-	rascher
*	Vinylbitalum	(+)	-	-	-
		(-)	wirksamer	-	angedeutet rascher

Tabelle 6: Vergleich zwischen seitenkettenaktiven * und im Ring ** (11,14) optisch aktiven Barbituraten.

LEBENSLAUF

Am 3o.11.1941 wurde ich als Sohn des Ingenieurs Walter Grund und seiner Ehefrau Berta, geb. Kogel, in Stuttgart geboren.

Von 1948 - 1952 besuchte ich die Volksschule in Weilimdorf bei Stuttgart. Nach neunjährigem Besuch des Dillmann - Gymnasiums legte ich dort am 8. März 1961 die Reifeprüfung ab.

Am 4. April 1961 wurde ich zur Gebirgstruppe nach Berchtesgaden einberufen, aus der ich Ende 1962 als Leutnant d.Res. ausschied.

Im Sommersemester 1963 begann ich an der Universität des Saarlandes mit dem Medizinstudium, bestand am 3o. Oktober 1964 das Vorphysikum und nach weiteren 3 Semestern am 21. April 1964 das Physikum.
Nach je einem in Innsbruck und Berlin verbrachten Semester kehrte ich im Wintersemester 1967/68 nach Homburg/Saar zurück, wo ich im Juli 1969 das Staatsexamen ablegte.

Herrn Professor Dr.med. W. RUMMEL danke ich für die Überlassung des Themas und die mir zuteil gewordene Unterstützung.

Herrn Dr.med. H. BÜCH bin ich zu großem Dank verpflichtet für die Mithilfe bei der Durchführung der Versuche und Ausarbeitung der Ergebnisse.